

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-116983

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月27日

(51) Int.Cl.⁴

識別記号

F I

C 1 1 B 3/02

C 1 1 B 3/02

C 0 7 C 67/60

C 0 7 C 67/60

69/587

69/587

C 1 1 B 1/02

C 1 1 B 1/02

3/10

3/10

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-303688

(22) 出願日

平成9年(1997)10月17日

(71) 出願人 594072993

日本化学飼料株式会社

北海道函館市浅野町3番6号

(72) 発明者 穂苅 勝利

北海道函館市大森町22-10

(72) 発明者 長谷川 栄治

北海道上磯郡上磯町久根別5-15-28

(72) 発明者 梅原 泰男

北海道函館市末広町5-18

(74) 代理人 弁理士 松井 光夫

(54) 【発明の名称】 ホタテガイ中腸腺から得られる高度不飽和脂肪酸含有油及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ホタテウロから効率良くホタテウロ油を採出し、エイコサペンタエン酸含有量が高く且つアラキドン酸含有量が低い高度不飽和脂肪酸含有油を得て、エイコサペンタエン酸又はそのエステルの原料として供する方法を提供する。

【解決手段】 ホタテガイ中腸腺にプロテアーゼを作用させて、遊離される高度不飽和脂肪酸含有油を分離採取し、次いで脱ガム工程、脱酸工程、及び脱色工程を含む工程により精製してホタテガイ中腸腺油を製造する方法。上記方法により得られるホタテガイ中腸腺油をエチルエステル化あるいはメチルエステル化し、尿素付加分別工程を含む工程により精製し、その脂肪酸組成が、エイコサペンタエン酸60%以上、且つアラキドン酸1.0%未満である高度不飽和脂肪酸含有油を製造する方法。

(1)

【特許請求の範囲】

【請求項1】ホタテガイ中腸腺にプロテアーゼを作用させて、遊離される高度不飽和脂肪酸含有油を分離採取し、次いで脱ガム工程、脱酸工程、及び脱色工程を含む工程により精製してホタテガイ中腸腺油を製造する方法。

【請求項2】請求項1の方法により得られるホタテガイ中腸腺油をエチルエステル化あるいはメチルエステル化し、尿素付加分別工程を含む工程により精製し、その脂肪酸組成が、エイコサペンタエン酸60%以上、且つアラキドン酸1.0%未満である高度不飽和脂肪酸含有油を製造する方法。

【請求項3】請求項1記載の方法により得られるホタテガイ中腸腺油。

【請求項4】請求項2記載の方法により得られる高度不飽和脂肪酸含有油を原料とすることを特徴とする純度96.5%以上のエイコサペンタエン酸エチル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、高度不飽和脂肪酸含有油の製造方法に関し、特にホタテガイ中腸腺を原料とした、エイコサペンタエン酸含有量が大きく、且つアラキドン酸含有量が低い高度不飽和脂肪酸含有油及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】エイコサペンタエン酸（以下「EPA」と称することがある）は様々な薬効を有するために、エチルエステル体として医薬品の認可を受けている。その

ホタテウロ粗油 (%)

EPA	31
AA	0.31
AA/EPA (%)	1.0%

イワシ粗油 (%)

20
1.2
6.0%

しかし、ホタテウロ油はイワシ油と違って圧搾により採油することができず、又タンパク質等も多く含まれているため、ホタテウロ油を原料としてEPAを製造することは、未だ工業的規模で行われていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】そこで本発明は上記の課題を解決し、ホタテウロから、EPA含有量が大きく、且つアラキドン酸重量濃度が低いホタテウロ油を効率良く製造し、高純度EPA又はそのエステルの原料として供する方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】すなわち本発明は、ホタテガイ中腸腺にプロテアーゼを作用させて、遊離される高度不飽和脂肪酸含有油を分離採取し、次いで脱ガム工程、脱酸工程、及び脱色工程を含む工程により精製して得られるホタテガイ中腸腺油及びその製造方法に関する。

【0007】又本発明は、上記の方法により得られるホ

製造法としては、高度不飽和脂肪酸の油脂を豊富に含有するイワシ、アンチョビー、メンヘーデン、ビルチャード等の魚を圧搾して採油し、得られる魚油を蒸留法、尿素付加分別法、クロマト分別法などの様々な手段を用いて精製し、精密蒸留等により濃縮して医薬品とする方法が用いられている。

【0003】上記方法において課題となっているのは、EPAと同じく高度不飽和脂肪酸の仲間であるドコサヘキサエン酸（以下「DHA」と称することがある）、及びアラキドン酸（以下「AA」と称することがある）の除去である。特にAAはEPAに極めて近い分子構造を有しながら、EPAとは逆の薬理作用を有し、また発疹等の障害を引き起こすと報告されており、その効率的な除去方法について種々の研究が為されている。特開平4-103558号には、EPAを銀錯体として抽出してAA等から分離精製する方法が開示されている。しかし、この方法は高価な硝酸銀を使用するために工業的に有利な方法とはいえない。

【0004】本発明者らは、原料油として、EPAの含有量が大きく、且つAAの含有量が低いものを用いれば、高価な分離手段に拠らずとも純度の高いEPAを得ることができると考え、種々の原料油を検討した。その結果、ホタテガイ中腸腺（以下「ホタテウロ」と称することがある）を原料とする油脂（以下「ホタテウロ油」と称することがある）が好適であるという知見を得た。ホタテウロ油は、粗油の段階でイワシ油と比較すると、以下に示すように脂肪酸組成でEPAが約10%多く、かつAAがイワシ油のその約4分の1程度である。

タテガイ中腸腺油をエチルエステル化あるいはメチルエステル化し、尿素付加分別工程を含む工程により精製し、その脂肪酸組成が、エイコサペンタエン酸60%以上、且つアラキドン酸1.0%未満である高度不飽和脂肪酸含有油を製造する方法に関する。

【0008】さらに、本発明は上記の方法により得られる高度不飽和脂肪酸含有油を原料とすることを特徴とする純度96.5%以上のエイコサペンタエン酸エチルに関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明において、高度不飽和脂肪酸とは不飽和度3以上の脂肪酸を意味し、高度不飽和脂肪酸含有油とは、高度不飽和脂肪酸及び/又はそのエステルを含有する油をいう。エステルには、メチルエステル、エチルエステル、トリグライド等の種々のエステルが含まれる。

【0010】本発明で用いられるホタテウロは、いずれの水揚げ地のものであってもよく、また生であつても、

茹であるものでもよいが、比較的油分含有量が高い5月から10月に水揚げされたものが好ましい。また、中腸腺以外の部位、例えば生殖腺、外套部、貝殻等が含まれていないものが、採油率を高くすることができる点と、油分中のEPA含有量が多い点で好ましい。

[2]

【0011】本発明においては、ホタテウロにプロテアーゼを作用させ、高度不飽和脂肪酸含有油を採取することを特徴とする。ホタテウロに加える水の量は、流動性の確保と油分の分離促進の点から、ホタテウロ1部あたり約0.1～10部、好ましくは2～5部が適切である。

【0012】プロテアーゼとしては、タンパク質を分解し得る酵素であれば、いずれの酵素であってもよく、それを単独であるいは混合して使用することができる。酵素の起源としては、動植物のほか微生物に由来するものでもよく、ペプシン、プロメライン、レニン、トリプシン、キモトリプシンの他、細菌プロテアーゼ、糸状菌プロテアーゼ、放線菌プロテアーゼ等も広く利用できる。これらの酵素は、市販されている精製品だけでなく、未精製酵素、酵素を含有する培養液または麹等の酵素含有物の形の物も使用することができる。

【0013】プロテアーゼの添加量は、その力価、および処理温度及び時間等に依存して適宜定められるが、典型的にはホタテウロ重量の0.01～5重量%、好ましくは0.1～2重量%である。

【0014】プロテアーゼの蛋白質分解反応は、約10～70℃、好ましくは30～50℃に加温し、pHを約3～9、好ましくは5～8に調整して、約0.5～24時間、好ましくは3～5時間攪拌して行う。所定時間後、反応を停止するために、10～15分間、90℃以上に加熱してプロテアーゼを失活させる。

【0015】上記反応で得られた液から、例えば遠心分離機にて3000～10,000rpmで5～10分間遠心分離をすること等によって、油分を分離採取する。このようにして採油率（抽出油重量/粗脂肪重量×100）、95%以上を達成することができる。

【0016】採取された粗油は、脱ガム工程、脱酸工程、及び脱色工程を含む工程により精製される。これらの工程の順序は特に限定されないが、脱色工程は最後に行うことが望ましい。

【0017】脱ガム方法としては、リン酸、ホウ酸又は食塩を加えて行う方法があるが、リン酸の添加による方法がガム質が容易に凝固する点で好ましい。生成するガム状物を遠心分離によって除去する。

【0018】脱酸方法としては、例えば酸性ソーダや炭酸ソーダ等の添加による中和法、メタノール、アセトン等の溶剤で洗浄する方法などがあるが、不純物、例えば色素、不ケン化物等を効率良く除去できる点で中和法が好ましい。また脱酸は連続法であっても回分法であってもよい。脱酸処理された油を、遠心分離し、脱酸油を採

取する。次いで脱酸油を水洗し、脱水する。

【0019】その後、酸性白土や活性白土、活性炭による吸着脱色等により脱色してホタテウロ油を得る。さらに、食用油として供する場合等には、脱臭工程等を施してもよい。

【0020】ホタテウロ油のエチルエステル化あるいはメチルエステル化は、公知のエステル交換法により行うことができ、例えばホタテウロ油に2%水酸化ナトリウムエタノール溶液又は10%硫酸エタノール溶液を添加して、約20～50℃で2～12時間加熱攪拌してエステル交換し、静置分離によりグリセリンを除去後、水洗することによって行う。

【0021】次に、上記エチルエステル化物あるいはメチルエステル化物を、尿素付加分別工程を含む工程により精製する。すなわち、エチルエステル化物あるいはメチルエステル化物に、1～5倍重量の、好ましくは3～4倍重量の尿素を加え、さらに該尿素の2～5倍容量のエタノール水溶液（約80～90%）又はアセトン水溶液（約80～90%）を加えて、60～70℃に加温し、尿素を溶解させる。約10分間、該温度で攪拌した後、5～30℃に冷却して尿素に付加する脂肪酸エステルを沈澱させ、濾別して除去する。濾液から溶媒を留去した後、水洗、脱水し、必要であれば上述したような方法で脱色工程を施す。

【0022】以上のようにして得られる高度不飽和脂肪酸含有油は、その脂肪酸組成が、エイコサペンタエン酸60%以上、アラキドン酸1.0%未満であることを特徴とする。このように、アラキドン酸のエイコサペンタエン酸に対する相対含有量が、2%以下、好ましくは1%以下、にすることができるので、それ以上銀錯体法や特殊なクロマトグラフ法等により精製しなくとも、精密蒸留法、又は通常の高速クロマトグラフ等を用いて、純度96.5%以上のエイコサペンタエン酸エチルを得ることができる。従って、工業的に極めて有利である。なお、本発明における脂肪酸組成は、脂肪酸メチルエステル又はエチルエステルをガスクロマトグラフィー分析して得られるクロマトグラムのピーク面積より求めた値をいい、その測定の詳細については後述する。

【0023】

【実施例】以下実施例により、本発明をより具体的に説明する。

【0024】

【実施例1】ホタテウロは北海道渡島管内で水揚げされたホタテガイを原料とし、同管内の水産加工場で排出されたものを用いた。表1にその一般性状を示す。該ウロ10kgに40リットルのイオン交換水と、パチルス属に属する微生物由来のプロテアーゼ（プロチンPC-10、大和化成株式会社製）100gを加え、50℃で4時間攪拌した。90℃で10分間加熱してプロテアーゼを失活後、3,000rpmで10分間遠心分離し、油

[3]

分640gを得た。採油率は95.5%であった。得られた油の一般性状及び脂肪酸組成を表2に示す。脂肪酸組成は、油を0.1Nナトリウムメチレートメタノール溶液でメチルエステル化し、下記条件のガスクロマトグ

ガスクロマトグラフィー条件

使用機器	GC-14B
キャリアガス	He、1ml/min
スプリット比	100:1
検出器	FID
カラム	DB-WAX (J&W)、0.25mmφ×30m、膜厚 0.25μm
インジェクション温度	250℃
カラム温度	210℃
検出器温度	250℃

表1 ホタテウロ性状

分析項目	重量%
水分	72.1
粗脂肪	6.70
粗蛋白質	14.47
粗灰分	2.43

表2 ホタテウロ油（粗製）の性状及び脂肪酸組成

分析項目	
酸価	3.7
ヨウ素価	186.7
ケン化価	181.3
色調 (G)	14
脂肪酸組成 (%)	
AA	0.31
EPA	31.66
DHA	8.19

次に、得られた油100gに、リン酸（85%）1gを添加し、生成した沈澱物を3,000rpmで10分間遠心分離して除去した後、10%水酸化ナトリウム水溶

表3 ホタテウロ油（精製油）から得られた脂肪酸混合物の組成

脂肪酸組成	(%)
AA	0.59
EPA	61.27
DHA	16.30

上記脂肪酸エチルエステル混合物を、精密蒸留し、純度96.5%のエイコサペンタエン酸エチルを得た。

【0026】

【比較例1】実施例1で用いたものと同じホタテウロ10kgをミキサーで破碎した後、イオン交換水40リットルを加え、50℃で4時間攪拌した。その後、90℃で10分間加熱し、3,000rpmで10分間遠心分離し、油分150gを得た。採油率は22.4%であり、実施例1に記載したプロテアーゼ処理を施した場合と比べて著しく低い値であった。

【0027】

【比較例2】イワシ油100gに2%水酸化ナトリウム

ラフィー分析に供し、得られたクロマトグラムにおける総ての脂肪酸メチルのピーク面積の総和に対する各脂肪酸メチルの面積%を計算して求めた。

液を3ml添加し、10分間攪拌した後、遠心分離により沈澱物を除去して脱酸した。次いで水洗、脱水後、活性白土（水澤化学株式会社製）5gを加えて脱色し、色調（G）8の精製油93gを得た。上記精製工程によるホタテウロ精製油の脂肪酸組成の変化は無く、粗油の脂肪酸組成と同一であった。

【0025】得られた精製油に2%水酸化ナトリウムエタノール溶液30mlを加え、30℃で10時間攪拌してエチルエステル化し、グリセリンを除去した後、水洗、脱水して脂肪酸エチルエステル混合物83gを得た。該混合物に尿素（試薬1級）300gと、85%エタノール水溶液750mlリットルとを加え、60℃に加温して尿素を溶解させた後、その温度で10分間攪拌後、20℃に冷却し、生成した沈澱物を濾別して除去した。濾液中の溶媒をロータリーエバポレーターで留去した後、水洗、脱水後、活性白土1gを加えて脱色し、表3に示す組成の脂肪酸エチルエステル混合物35gを得た。

エタノール溶液30mlを加え、30℃で10時間攪拌することによりエチルエステル化し、グリセリンを除去した後、水洗、脱水して脂肪酸エチルエステル混合物92gを得た。該混合物に尿素360gと、85%エタノール水溶液900mlリットルとを加え、60℃に加温して尿素を溶解させた後、20℃に冷却し、生成した沈澱物を濾別して除去した。濾液中の溶媒をロータリーエバポレーターで留去した後、水洗、脱水後、活性白土1gを加えて脱色し、表4に示す組成を有する脂肪酸エチルエステル混合物33gを得た。

【0028】

表4 イワシ油から得られた脂肪酸混合物の組成

脂肪酸組成	(%)
AA	3.34
EPA	44.35
DHA	20.32

表3と表4を比較すると、ホタテウロ油はイワシ油に比べ、EPA含有量が高く、且つAA含有量が低く優れたEPA原料であることが分かる。

【0029】

【発明の効果】本発明によれば、ホタテウロをプロテア

ーゼ処理し適切な精製工程を施すことによって、効率良くホタテウロ油を製造することができる。該ホタテウロ油はイワシ油等に比べてEPA含有量が高く、且つAA含有量が低いので、尿素付加工程による分別だけで、その脂肪酸組成がエイコサペンタエン酸60%以上、且つアラキドン酸1.0%未満である高度不飽和脂肪酸含有油を得ることができ、高純度エイコサペンタエン酸エチルの好適な原料として供することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

C11B 3/16
C11C 3/06
C12P 7/64

FI

C11B 3/16
C11C 3/06
C12P 7/64

[1]

[Claims]

[Claim 1] A method for producing scallop mid-gut grand oil wherein the method comprises allowing protease to act on scallop mid-gut grand, separating and collecting the liberated highly unsaturated fatty acid-containing oil, and purifying by a process that includes a degumming step, a deacidifying step, and a decoloring step.

[Claim 2] A method for producing a highly unsaturated fatty acid-containing oil having a fatty acid composition comprising 60% or more of eicosapentaenoic acid and less than 1.0% of arachidonic acid, wherein the method comprises ethyl-esterifying or methyl-esterifying scallop mid-gut grand oil obtained by the method according to claim 1, and purifying by a process that includes a separating process by urea addition.

[Claim 3] Scallop mid-gut grand oil obtained by the method according to claim 1.

[Claim 4] Ethyl eicosapentaenoate having a purity of 96.5% or more wherein its raw material is a highly unsaturated fatty acid-containing oil obtained by the method according to claim 2.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Technical Field of Industrial Application]

The present invention relates to a production method of a highly unsaturated fatty acid-containing oil, and more particularly, to a highly unsaturated fatty acid-containing oil derived from scallop mid-gut grand and containing a high content of eicosapentaenoic acid and a low content of arachidonic acid, and a production method thereof.

[0002]

[Prior Art]

Since eicosapentaenoic acid (hereinafter sometimes referred to as "EPA") has various pharmacological effects, its ethyl ester form has been approved for use as a pharmaceutical. The method used for its production comprises: pressing fish such as sardines, anchovies, menhadens, and pilchards that are rich in oils of highly unsaturated fatty acids; collecting the oil; purifying the resulting fish oil by various means such as distillation, separation by urea addition, or chromatographic separation; and concentrating by precision distillation to obtain a pharmaceutical.

[0003]

The task to be achieved for the aforementioned method is the removal of docosahexaenoic acid (hereinafter sometimes referred to as "DHA") and arachidonic acid (hereinafter sometimes referred to as "AA"), which are also highly unsaturated fatty acids similar to EPA. In particular, despite AA has an extremely similar molecular structure to EPA, it has the opposite pharmacological action, and has also been reported to cause disorders such as rashes. Consequently, various researches have been conducted on methods for its efficient removal. Unexamined Published Japanese Patent Application No. Hei 4-103558 discloses a

method for extracting EPA as a silver complex and then separating and purifying it from AA and the like. However, this method cannot be said to be an industrially advantageous method since it uses expensive silver nitrate.

[0004]

The inventors of the present invention conducted studies on various raw material oils, based on the idea that highly pure EPA can be obtained without relying on expensive purification means when using a raw material oil that has a high content of EPA and a low content of AA. As a result, findings were obtained indicating that oil (hereinafter sometimes referred to as "scallop waste product oil") derived from scallop mid-gut grand (hereinafter sometimes referred to as "scallop waste product (Hotateuro)") is suitable for this. Comparing the fatty acid composition of scallop waste product oil with that of sardine oil at the stage of the crude oil, the EPA content of scallop waste product oil is 10% higher than that of sardine oil, while the content of AA is roughly only one-fourth that of sardine oil, as indicated in the table below.

	Scallop waste product crude oil (%)	Sardine crude oil (%)
EPA	31	20
AA	0.31	1.2
AA/EPA (%)	1.0%	6.0%

However, Unlike sardine oil, since scallop waste product oil cannot be collected by pressing and it also contains high levels of proteins and so forth, the production of EPA from scallop waste product oil has yet to be carried out on an industrial scale.

[0005]

[Problems to be Solved by the Invention]

Therefore, in order to solve the aforementioned problems, the object of the present invention is to provide a method for efficiently producing scallop waste product oil having a high EPA content and low arachidonic acid weight concentration from scallop waste product, and provide it as a raw material of highly pure EPA or ester thereof.

[2]

[0011]

The present invention comprises allowing protease to act on scallop waste product followed by collection of highly unsaturated fatty acid-containing oil. The amount of water added to the scallop waste product is about 0.1 to 10 parts, or preferably 2 to 5 parts, per 1 part of scallop waste product from the viewpoint of ensuring fluidity and promoting separation of

oily components.

[0012]

Any enzyme capable of decomposing protein may be used for protease, and the protease may be used alone or as a mixture. The enzyme source may be an animal, plant or microbe, and a wide range of enzymes can be used, examples of which include pepsin, bromelain, renin, trypsin and chymotrypsin as well as bacterial proteases, mold proteases and actinomycete proteases. In addition to commercially available purified products, these enzymes can be used in the form of unpurified enzymes, culture liquid containing enzyme or materials containing enzymes such as malted rice.

[0013]

Although the added amount of protease is suitably determined depending on the titer, treatment temperature and time, etc., it is typically 0.01 to 5% by weight, and preferably 0.1 to 2% by weight, of the weight of the scallop waste product.

[0014]

The protein decomposition reaction of protease is carried out by heating to about 10 to 70°C, or preferably 30 to 50°C, adjusting to a pH of about 3 to 9, or preferably 5 to 8, and stirring for about 0.5 to 24 hours, or preferably for 3 to 5 hours. After a predetermined amount of time, the protease is deactivated by heating to 90°C or higher for 10 to 15 minutes to stop the reaction.

[0015]

The oily component is separated and collected from the liquid obtained in the aforementioned reaction by, for example, centrifuging for 5 to 10 minutes at 3000 to 10000 rpm with a centrifuge. In this manner, an oil collection yield (weight of extracted oil/weight of crude fat x 100) of 95% or higher can be attained.

[3]

[0024]

[Example 1]

Scallop waste product used was obtained from scallops caught within the jurisdiction of Oshima, Hokkaido, and discharged from a marine product processing plant in the same area. The general properties of this scallop waste product are shown in Table 1. 40 liters of ion exchanged water and 100 g of protease originating in a microbe belonging to the genus *Bacillus* (Protin PC-10, Daiwa Kasei K.K.) were added to 10 kg of this scallop waste product followed by stirring at 50°C for 4 hours. After deactivating the protease by heating for 10 minutes at 90°C, the mixture was centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm to obtain 640 g of an oily component. The oil collection yield was 95.5%. The general properties and fatty acid composition of the

resulting oil are shown in Table 2. The fatty acid composition was determined by subjecting the oil methyl-esterified with 0.1 N sodium methylate methanol solution to gas chromatographic analysis under the conditions indicated below, and calculating the area percent of each methyl fatty acid with respect to the total peak area of all methyl fatty acids in the resulting chromatogram.

Gas Chromatography Conditions

Instrument used	GC-14B
Carrier gas	He, 1 ml/min
Split ratio	100:1
Detector	FID
Column	DB-WAX (J&W), 0.25 mm ϕ x 30 m, film thickness: 0.25 μ m
Injection temperature	250°C
Column temperature	210°C
Detector temperature	250°C

Table 1 Properties of Scallop Waste Product

Analyzed Parameter	Percent by weight
Moisture	72.1
Crude fat	6.70
Crude protein	14.47
Crude ash	2.43

Table 2 Properties and Fatty Acid Composition of Scallop Waste Product Oil (Crude Oil)

Analyzed Parameter	
Acid value	3.7
Iodine value	186.7
Saponification value	181.3
Color tone (G)	14
Fatty Acid Composition	(%)
AA	0.31
EPA	31.66
DHA	8.19

Next, 1 g of phosphoric acid (85%) was added to 100 g of the resulting oil, and the formed precipitate was removed by centrifuging for 10 minutes at 3,000 rpm. Deacidification

was then carried out by adding 3 ml of 10% aqueous sodium hydroxide solution to the oil followed by stirring for 10 minutes and removing the precipitate by centrifugation. Next, after washing with water and dehydrating, the oil was decolorized by adding 5 g of activated clay (Mizusawa Industrial Chemicals, Ltd.) to obtain 93 g of purified oil having a color tone (G) of 8. There were no changes in the fatty acid composition of the scallop waste product purified oil resulting from the aforementioned purification process, and it was the same as the fatty acid composition of the crude oil.

[0025]

The resulting purified oil was ethyl-esterified by adding 30 ml of 2% sodium hydroxide ethanol solution and stirring at 30°C for 10 hours. After removing the glycerin, the oil was washed with water and then dehydrated to obtain 83 g of a fatty acid ethyl ester mixture. 300 g of urea (reagent grade 1) and 750 ml of 85% aqueous ethanol solution were added to this mixture followed by dissolving the urea by heating to 60°C, stirring for 10 minutes at that temperature, cooling to 20°C and then removing the formed precipitate by filtration. After distilling off the solvent in the filtrate with a rotary evaporator, the resulting product was washed with water and dehydrated followed by decoloring by adding 1 g of activated clay to obtain 35 g of a fatty acid ethyl ester mixture having the composition shown in Table 3.

Table 3 Composition of Fatty Acid Mixture Obtained from Scallop Waste Product Oil (Purified Oil)

<u>Fatty Acid Composition</u>	<u>(%)</u>
AA	0.59
EPA	61.27
DHA	16.30

The aforementioned fatty acid ethyl ester mixture was precision distilled to obtain ethyl eicosapentaenoate having a purity of 96.5%.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)